

## ⑫ 公開特許公報(A)

平1-125357

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成1年(1989)5月17日  
 C 07 C 103/50 D-8519-4H  
 A 61 K 37/64 ABN 8615-4C  
 ABU  
 C 07 C 103/84 A-7419-4H  
 C 07 K 5/02 Z-8318-4H  
 // C 12 N 9/99 8717-4B 審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 トリペプチドの誘導体

⑰ 特 願 昭62-281873

⑱ 出 願 昭62(1987)11月6日

⑲ 発 明 者 沢 山 忠 弘 兵庫県川西市萩原台西2丁目182番地  
 ⑲ 発 明 者 西 村 和 也 大阪府吹田市江坂町4丁目23番7-102  
 ⑲ 発 明 者 出 口 貴 司 大阪府豊中市蛍池東町1丁目4番6-405号  
 ⑲ 出 願 人 大日本製薬株式会社 大阪府大阪市東区道修町3丁目25番地  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 坪井 有四郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

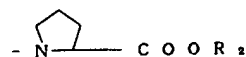
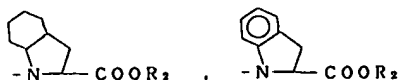
トリペプチドの誘導体

## 2. 特許請求の範囲

(1) 次式で表わされるトリペプチドの誘導体及びその塩類



(式中、Rは水素、低級アルキル又はベンジルを意味し、R<sub>1</sub>は-(NH)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N $\square$ N-Yを意味する。ここにおいて、mは0又は1の整数を表わし、nは0~4の整数を表わし、Wは水素、カルボキシル、アミノ又はヒドロキシを表わし、Yは水素、低級アルキル、フェニル又はベンジルを表わす。R<sub>2</sub>は水素又は低級アルキルを意味し、R<sub>3</sub>は次式で表わされる基を意味する。

又は-N(R<sub>4</sub>)-CH(R<sub>2</sub>)-COOR<sub>2</sub>

ここにおいてR<sub>4</sub>はC<sub>4</sub>-8シクロアルキル又はヘロゲン、低級アルコキシ若しくはヒドロキシで置換されていてもよいフェニルを表わす。)

## 3. 発明の詳細な説明

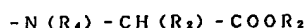
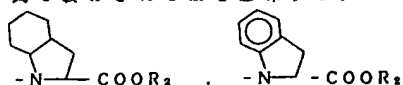
本発明は新規なトリペプチドの誘導体及びその塩類に関し、更に詳細には次式で表わされるトリペプチドの誘導体(以下「本発明の化合物」という)及びその塩類に関する。



(式中、Rは水素、低級アルキル又はベンジルを意味し、R<sub>1</sub>は-(NH)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N $\square$ N-Yを意味する。ここにおいて、mは0又は1の整数を表わし、nは0~4の整数を表わし、Wは水素、カルボキシル、アミノ又はヒドロキシを表わし、Yは水素、低級

アルキル、フェニル又はベンジルを意味す。

R<sub>2</sub>は水素又は低級アルキルを意味し、R<sub>3</sub>は次式で表わされる基を意味する。



ここにおいてR<sub>4</sub>はC<sub>4-8</sub>シクロアルキル又はハロゲン、低級アルコキシ若しくはヒドロキシで置換されていてもよいフェニルを意味す。)

ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry) 28(11) 1606 ~ 1611 (1985) には、アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme; 以下「ACE」と略す) 阻害剤として次の化合物が開示されている。

1-(L-リジル-7-D-グルタミル)インドリン-2(S)-カルボン酸

1-(N<sup>3</sup>, N<sup>6</sup>-ジベンジロキシカルボニル-

3

は、種々の酸、例えば塩酸、硫酸などの無機酸、トリフルオロ酢酸、酢酸などの有機酸との塩を形成し得る。又、本発明の化合物がカルボキシル基を有する場合には、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩などの無機塩基、塩基性アミノ酸塩などの有機塩基との塩の形で存在し得る。特に製薬学的に許容される塩が好ましい。

本発明の化合物は水和物又はジオキサソ-水との溶媒和物のような溶媒和物の形で存在することもでき、本発明の化合物にはそのような水和物又は溶媒和物も含まれる。

本発明の化合物は少なくとも1個の不斉炭素原子を有する。従って、本発明の化合物は立体異性体又はそれらの混合物として存在するが、これらはいずれも本発明に包含される。グルタミン酸部分のα位炭素原子の立体配置はD型が、R<sub>3</sub>において-COOR<sub>2</sub>が結合している炭素原子の立体配置はL型アミノ酸と類似の配置が好ましい。

5

L-リジル-7-D-グルタミル)インドリン-2

(S)-カルボン酸

この2化合物は、本発明の化合物のRに相当する部分がアミノ又はベンジロキシカルボニルアミノである点で本発明の化合物とは構造的に全く異なるものである。

本発明者の化合物は主としてACE阻害作用に基づく、高血圧症、脳血管性心不全その他の循環器疾患の治療剤として有用である。

本明細書において、「低級アルキル」とは、炭素原子数が5個以下の直鎖又は分枝鎖状のアルキル基を意味する。好ましい低級アルキル基としてはメチル、エチル、イソプロピルが挙げられる。

「低級アルコキシ」としては、メトキシ、エトキシ、tert-ブトキシ、n-ペンチロキシ等が挙げられる。

「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素及び/又はヨウ素を意味する。

本発明の化合物がアミノ基を有する場合に

4

本発明の化合物は、例えば、下記式



(式中、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は前掲に同じ。)

で示される化合物又はその酸付加塩に、下記式



(式中、R及びR<sub>1</sub>は前掲に同じ。)

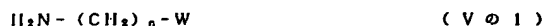
で表わされる化合物又はそのカルボキシル基における反応性基を反応させ、必要に応じて、得られた化合物から保護基を除去し、また、必要に応じて塩に変換することにより合成することができる。

(III)式化合物のうち、R<sub>1</sub>が-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Wの化合物又はR<sub>1</sub>が-N-N-Yの化合物は、下記式



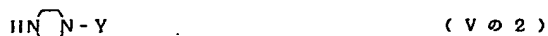
(式中、Xはハロゲンを意味し、R<sub>7</sub>は低級アルキル又はベンジルを意味し、Rは前掲に同じ。)で表わされる化合物を、下記式

6



(式中、n及びWは前掲に同じ。)

又は



(式中、Yは前掲に同じ。)

で表わされる化合物と反応させ、必要に応じて、得られた化合物からカルボキシル基の保護基を除去することによって合成することができる。

上記の式(II)の化合物と式(III)の化合物との反応は、ペプチド合成の分野における常法(「ペプチド合成の基礎と実験」泉屋信夫、他著(丸善株式会社発行)89~131頁参照)に従って行うことができる。

式(III)の化合物のR<sub>1</sub>が一級又は二級アミノ基又はカルボキシル基である場合は、それらの基が保護されたものを用いるのが好ましい。式(III)の化合物を遊離のカルボン酸の形で式(II)の化合物と反応させる場合には、式(II)の-COO R<sub>2</sub>は保護された形のものを用いるのが好ましく、例えば、N, N-ジシクロヘキシルカルボイミ

7

トラヒドロフラン、ジオキサソ、クロロホルム、塩化メチレン、酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、エタノール、メタノール、水が挙げられる。これらの溶媒はそれぞれ単独で又は2種類以上混合して用いてもよい。反応副生成物として酸が生じる場合、式(II)の化合物が酸付加塩の場合又はこの化合物が遊離のカルボン酸基を有する場合には、その反応は、酸受容体として、塩基の存在下に行うのが好ましい。用いる塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの水酸化アルカリ、重曹、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸アルカリ若しくは炭酸水系アルカリ又はトリエチルアミン、N-メチルモルホリン、ジシクロヘキシルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基が挙げられる。

上記反応において、ペプチド合成において通常行われているように、アミノ基又はカルボキシル基が保護された形の原料化合物を使用することが

で、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボイミド塩酸塩、カルボニルジイミダゾール、ジフェニルホスホリルアジド、シアノリソ酸ジエチル等の縮合剤の存在下に好適に行われる。カルボイミド類を縮合剤として使用する際には、ラセミ化を抑制するために、場合により、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシニミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等を反応系中に加えてもよい。

このような縮合剤を用いる代りに、式(III)の化合物はカルボキシル基における反応性誘導体の形で、式(II)のアミン化合物と反応させてもよい。

式(III)の化合物のカルボキシル基における反応性誘導体としては、例えば酸ハライド、酸アジド、混合酸無水物、活性エステル、活性アミド等が挙げられる。

上記の反応は、通常、溶媒中-40~40℃で行うことができる。用いる溶媒としては、例えば、テ

8

できる。保護基としてはペプチド合成の分野において用いられるものは全て使用することができるが、目的に応じて保護基を選択することが好ましい(「ペプチド合成の基礎と実験」泉屋信夫、他著(丸善株式会社発行)148~152頁参照)。アミノ保護基としては、例えば、ベンジロキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、3-ニトロ-2-ピリジン-スルフェニル等が挙げられる。反応後、これらの保護基を常法に従って脱離させることができる。

カルボキシル基の保護基としては、例えばメチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル等が挙げられる。これらの除去には、希アルカリ(例えば、1~2N-NaOH又はKOH)を用いて加水分解を行うことにより脱離されさせることができる。ベンジロキシカルボニル基又はベンジルエステルのベンジル基の除去には、例えば、パラジウム黒、パラジウム炭素若しくはパラジウム炭素-蟻酸アンモニウム存在下、接触還元を行うか又はHBr/AcOHを作用させるのが好都合である。

9

10

tert-ブトキシカルボニル基又はtert-ブトキシエステル基の除去は、例えば、水冷又は室温下、トリフルオロ酢酸等の強酸を作用させることにより行うことができる。

又、上記のようにして製造される本発明の化合物は、必要に応じて常法により、前述したような塩に変えることができる。

本発明の化合物又はその塩は、既知の精製手段、例えば、抽出、濃縮、中和、濾過、再結晶化、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー又はイオン交換樹脂等を適宜組み合わせるにより、単離、精製することができる。

本発明の化合物及びその塩は主としてACE阻害作用に基づく、高血圧、腎血性心不全その他の循環器疾患の治療剤として有用である。

本発明の化合物の薬理作用について以下に説明する。

#### In vitroにおけるACE阻害作用

ウサギ肺より調製したACE、合成基質ヒプリル-

L-ヒスチジル-L-ロイシン(5mM)、塩化ナトリウム(300mM)及びリン酸緩衝液(100mM, pH8.3)を混合し、全量0.300mLで37℃、30分間反応させた。1規定の塩酸0.300mLを加えて反応を停止させた後、生成したヒプリン酸を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルを除去した後、蒸留水を加え、分光光度計(日立100-41)を用い228nmの吸光度を測定し、ヒプリン酸の量を求めた。

ACE阻害作用の強さは反応液中に試験化合物を加えた時の酵素活性を対照試験の酵素活性と比較して算出した。IC<sub>50</sub>値(50%阻害濃度)は濃度-阻害作用曲線から求めた。結果を第1表に示す。

(以下余白)

11

12

第1表

試験化合物	ACE阻害作用(IC <sub>50</sub> :M)
実施例1の化合物	2.1×10 <sup>-7</sup>
実施例2の化合物	4.6×10 <sup>-7</sup>
実施例6の化合物	3.1×10 <sup>-7</sup>
実施例7の化合物	7.8×10 <sup>-8</sup>
実施例8の化合物	2.2×10 <sup>-7</sup>
実施例9の化合物	1.5×10 <sup>-8</sup>
実施例1第4工程の化合物	3.3×10 <sup>-7</sup>

本発明を更に詳細に説明するため、以下に実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。以下において、2とはベンジロキシカルボニルを意味する。

#### 実施例1

(2S,3aS,7aS)-1-[N-(2(R)-ビベラジニルプロピオニル)-7-O-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

#### 第1工程

2(S)-プロモプロピオン酸28gをトルエン50mLに溶解し、ベンジルアルコール42g、パラトルエンホルホン酸1.2gを加え、1時間加熱還流させた。ト

ルエンを減圧留去し、残留物をクロロホルム抽出した。抽出液を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固した。残留物を減圧蒸留し、ベンジル 2(S)-プロモプロピオネート17.0gを得た。bp105~108℃  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -6.5° (c=1.65, メタノール)

#### 第2工程

1-ベンジルビベラジン1.6g、トリエチルアミン0.9gをアセトニトリルに溶解し、これにベンジル(2)-プロモプロピオネート2.2gを加えて室温5時間攪拌反応させた。アセトニトリルを減圧留去後、残留物をクロロホルム抽出し、抽出液を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮乾固し、残留物2.5gを得た。このうち2gをメタノール10mLに溶解し、これに1N-NaOH9mLを加え、室温で2時間攪拌反応させた。希塩酸を加えて中和後、メタノールを減圧留去し、残留物をCHP20P(三菱化成(株))(75~150μ)の2.5φ×40cmのカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)により精

13

—454—

14

製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、2(R)-(4-ベンジルピペラジニル)プロピオン酸1.0gを得た。

### 第3工程

N- $\gamma$ -O<sup>1</sup>-エチル-D-グルタミン酸24.5gとエチル(2S,3aS,7aS)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボキシレート塩酸塩17.5gとトリエチルアミン7.58gを含む塩化メチレン溶液に水溶性カルボジイミド塩酸塩15.8gを加えて室温一夜攪拌した。反応溶液を飽和重曹水、水、10%塩酸、水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固して、油状物質34.1gを得た。これをエタノール400mlに溶解し、10%パラジウム炭素3gを加え、室温攪拌下、蟻酸アンモニウム12gを3回にわけて加えた。1時間後、触媒を濾去し、濾液を塩酸酸性にし、減圧濃縮乾固した。残留物に水を加えて溶解し、酢酸エチルで洗浄した。水層に重曹を加えアルカリ性とした後、塩化メチレンで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮乾固して油状物質としてエチル(2S,3aS,7aS)-1-(O<sup>1</sup>-エチル- $\gamma$ -D-グルタミル)オ

15

す)0.7gを加え、室温3時間攪拌反応させた。反応液をクロロホルム抽出し、抽出液を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固し、2(R)-(4-ベンジルピペラジニル)プロピオン酸 N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルを得た。これをTHFに溶解し、(2S,3aS,7aS)-1-( $\gamma$ -D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸1.0gと重曹0.5gを溶解したTHF-水の混合溶媒に室温で滴加した。室温3時間攪拌反応後、THFを減圧留去し10%クエン酸を加えて酸性にし、CHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→40%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(4-ベンジルピペラジニル)プロピオニル]- $\gamma$ -D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸0.8gを得た。

$[\alpha]_D^{20} - 20.7^\circ$  (c=0.49, 1N-NaOH)

$C_{28}H_{40}N_4O_8 \cdot 2.5H_2O$  として

理論値 C:58.62 H:7.91 N:8.77

実験値 C:58.49 H:7.73 N:8.82

17

クタヒドロ-1H-インドール-2-カルボキシレート(以下「ジエステル」という)23.5gを得た。この内23gをエタノール150mlに溶解し、これに1N-NaOH 210mlを加えて、室温5.5時間攪拌した。塩酸酸性にした後、減圧濃縮し、残留溶液をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→30%アセトニトリル/水勾配)で精製し、精製画分を減圧濃縮乾固して0.31gを得た。精製不十分な画分は減圧濃縮乾固し、残留物の水溶液を重曹を用いて中和後、再びCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→30%アセトニトリル/水勾配)で精製し、8.70gを得、合せて(2S,3aS,7aS)-1-( $\gamma$ -D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸(mp191~192℃)15.01gを得た。

### 第4工程

第2工程で得た2(R)-(4-ベンジルピペラジニル)プロピオン酸0.8gをクロロホルム8mlに溶解し、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.4g、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(以下「水溶性カルボジイミド塩酸塩」と略

16

### 第5工程

この内0.4gと蟻酸0.5gをメタノールに溶解し、パラジウム黒0.1gを加えて4時間加熱還流させた。触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮乾固した後、残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→35%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、目的化合物0.2gを得た。 $[\alpha]_D^{20} - 0.1^\circ$  (c=0.71, H<sub>2</sub>O)

$C_{21}H_{24}N_4O_8 \cdot 1.25H_2O$  として

理論値 C:54.71 H:7.98 N:12.15

実験値 C:54.93 H:8.00 N:11.95

### 実施例2

(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(n-ブチルアミノ)プロピオニル]- $\gamma$ -D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

### 第1工程

n-ブチルアミン1.0gとトリエチルアミン1.4gをクロロホルムに溶解し、これにベンジル 2(R)-プロモプロピオネート3.4gを室温で滴加して一夜攪拌反応させた。反応液をクロロホルムで抽出し、有

18

機層を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固して残留物2.0gを得た。これをメタノールに溶解し、1N-NaOH10mlを加え室温1時間攪拌反応させた。希塩酸を加えて中和後、溶媒を減圧留去し残留物をC18P20Pカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、2(R)-n-ブチルアミノプロピオン酸2.0gを得た。

#### 第2工程

このうち1.0gを1N-NaOH10mlに溶解後、氷冷し塩化ベンジルオキシカルボニル1.2gを滴加し、室温で2時間攪拌反応させた。希塩酸を加えて酸性にし、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固して2(R)-(n-ブチルベンジルオキシカルボニルアミノ)プロピオン酸0.8gを得た。

#### 第3工程

この残留物0.8gをアセトニトリルに溶解し、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.30gと水溶性カルボジ

イミド塩酸塩0.6gを加え、室温で一晩攪拌反応させた。クロロホルムで抽出し、有機層を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固し、2(R)-(n-ブチルベンジルオキシカルボニルアミノ)プロピオン酸 N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルを得た。これを実施例1第4工程で用いた2(R)-(4-ベンジルピペラジニル)プロピオン酸 N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルの代わりに使用し、以下第5工程と同様の処理に付し、目的物0.39gを得た。 $[\alpha]_D^{25} -30.3^\circ$  (c=0.43, 1N-NaOH)

$C_{20}H_{32}N_2O_6 \cdot 0.5H_2O$ として

理論値 C:57.26 H:7.93 N:10.02

実験値 C:57.27 H:8.39 N:9.58

#### 実施例3

(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(2-カルボキシエチルアミノ)プロピオニル]-7-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

#### 第1工程

$\beta$ -アラニンメチルエステル パラトルエンシル

19

ホン酸塩3gとトリエチルアミン2.2gをアセトニトリルに溶解しベンジル 2(S)-プロモプロピオネート2.0gを滴加させ、室温で3.5時間攪拌反応させた。クロロホルムで抽出し、有機層を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固してベンジル 2(R)-(2-メトキシカルボニルエチルアミノ)プロピオネート1.4gを得た。

#### 第2工程

これをジオキサランに溶解し、 $\beta$ -tert-ブチルシカーボネート1.2gを加え室温2時間攪拌反応させた。クロロホルムで抽出し、有機層を10%クエン酸、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固して残留物1.4gを得た。これをメタノールに溶解し、パラジウム黒0.3gを加え、常圧接触還元を室温で2時間行った。触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮乾固して、2(R)-(2-メトキシカルボニルエチル-tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピオン酸0.8gを得た。

#### 第3工程

20

これをクロロホルムに溶解し、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.35gと水溶性カルボジイミド塩酸塩0.6gを加え、室温2時間反応させた。クロロホルムで抽出し、抽出液を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固した。これをTHFに溶解し、(2S,3aS,7aS)-1-(7-D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸0.9gと重曹0.5gを溶解したTHF-水の混合溶媒に室温で滴加し、室温3時間攪拌反応させた。溶媒を減圧留去し、10%クエン酸を加えて酸性にし、C18P20Pカラムクロマトグラフィー(0%→70%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(2-メトキシカルボニルエチル-tert-ブトキシアミノ)プロピオニル]-7-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸1.2gを得た。

#### 第4工程

これをアセトニトリルに溶解して1N-NaOH10mlを加え、室温2時間攪拌反応させた。10%クエン酸を

21

22

加えて酸性とし、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮乾固して残留物0.8gを得た。これをトリフルオロ酢酸に溶解して室温で1時間攪拌反応させた。反応液を減圧留去して残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し目的物0.3gを得た。

$[\alpha]_D - 16.8^\circ$  ( $c=0.97, 1N-NaOH$ )

$C_{20}H_{21}N_3O_8 \cdot 1.5H_2O$  として

理論値 C:51.27 H:7.31 N:8.87

実験値 C:51.31 H:7.40 N:8.89

同様にして次の化合物を合成した。

#### 実施例 4

(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(3-カルボキシプロピルアミノ)プロピオニル]-7-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

$[\alpha]_D - 27.1^\circ$  ( $c=0.37, 1N-NaOH$ )

$C_{21}H_{23}N_3O_8 \cdot 0.75H_2O$  として

理論値 C:53.78 H:7.41 N:8.88

23

酸1.0gを得た。これをトリフルオロ酢酸に溶解して室温1時間攪拌反応させた。溶媒を減圧留去し、残留物に1N-NaOHを加えて中和し、CHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→30%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固して目的物0.12gを得た。

$[\alpha]_D - 22.1^\circ$  ( $c=0.36, H_2O$ )

$C_{20}H_{24}N_4O_8 \cdot 0.4H_2O \cdot 0.1CH_3CN$  として

理論値 C:55.42 H:8.08 N:13.12

実験値 C:55.33 H:8.57 N:13.44

#### 実施例 6

N-[2(S)-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニル]-7-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン

##### 第1工程

p-メトキシアニリン10.8gとN-メチルモルホリン7.4gをクロロホルム80mlに溶解し、2(R)-プロモプロピオン酸10.0gを加え、3.5時間加熱還流した。冷却後、結晶を濾取しN-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン8.3gを得た。この内7.3gと塩化

実験値 C:54.00 H:7.72 N:8.08

#### 実施例 5

(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(3-アミノプロピルアミノ)プロピオニル]-7-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

##### 第1工程

トリメチレンジアミン20gに氷冷下、塩化トリチル7.0gを滴加し、0~5℃で30分間攪拌反応させた。反応液を水、アセトニトリルで希釈しCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→100%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固して、モノトリチル体7.3gを得た。

##### 第2工程

この内5.1gを実施例3第1工程で用いたβ-アラニンメチルエステルバタールエンズルホン酸塩の代わりに使用し、以下、実施例3第2工程、第3工程と同様の処理に付し、(2S,3aS,7aS)-1-[N-[2(R)-(3-トリチルアミノプロピル-tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピオニル]-7-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン

24

酸6.7gをエタノール70mlに溶解し4時間加熱還流した。減圧濃縮し、残留物をクロロホルムで抽出した。有機層は5%重曹水、水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固して、N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニンエチルエステル8.0gを得た。

##### 第2工程

この内7.9gとN-メチルモルホリン3.6gをアセトニトリル60mlに溶解し、3-(4(R)-3-ベンジルオキシカルボニル-5-オキソオキサゾリジン-4-イル)プロピオン酸塩化物11.0gを加え5時間加熱還流した。減圧濃縮し、残留物をクロロホルムで抽出した。有機層は10%クエン酸、5%重曹水、水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:クロロホルム)により精製し、N-[3-(4(R)-3-ベンジルオキシカルボニル-5-オキソオキサゾリジン-4-イル)プロピオニル]-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニンエチルエステル0.8gを得た。この内0.85gと酢酸ナトリウム1.0

25

-457-

26

4gをエタノールに溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮乾固し、残留物を酢酸エチルで抽出した。有機層を10%塩酸、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固した。残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(40%→80%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、N-ベンジロキシカルボニル-0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン エチルエステル3.5gを得た。

## 第3工程

この内2.7gをエタノール50mlに溶解し、10%パラジウム炭素0.5gを加え、室温攪拌下、蟻酸アンモニウム2gを加えた。2時間後触媒を除去し、濾液を減圧濃縮乾固した。残留物を塩化メチレンで抽出し、5%重曹水、水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固して、0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン1.83gを得た。

## 第4工程

この内0.5gをジオキサン20ml-水10mlの混合溶媒に溶解し、これに1N-NaOH3.6mlを加え室温で一晩攪拌した。希塩酸を加え中性とし、半濃縮後CHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)で精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、残留物をジオキサン-水の混合溶媒に溶解し、凍結乾燥した。白色粉末として目的物0.19gを得た。

$[\alpha]_D - 0.8^\circ$  (c=0.6, エタノール)

$C_{28}H_{36}N_4O_7 \cdot 1H_2O \cdot 0.2dioxane$ として

理論値 C:60.03 H:6.93 N:8.72

実験値 C:59.88 H:6.71 N:8.46

## 実施例7

N-[3-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニル]-γ-D-グルタミル-N-シクロヘブチル-DL-アラニン

## 第1工程

シクロヘブチルアミン30gとN-メチルモルホリン10.7gをアセトニトリル40mlに溶解し、エチル2(RS)-プロモプロピオネート18.2gを加え、室温

4-フェニルピペラジニル2.0gを塩化メチレン20mlに溶解し、これに2(R)-プロモプロピオン酸5.3gを加え、室温で一晩攪拌した。減圧濃縮乾固し、残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→30%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を集め、減圧濃縮乾固し、2(S)-(4-フェニルピペラジニル)プロピオン酸(mp200~208°分解)2.0gを得た。この内0.6gと第3工程で得た0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン エチルエステル0.8gと水溶性カルボジイミド塩酸塩0.40gとを塩化メチレン内中、室温で一晩攪拌した。反応液を5%重曹水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:クロロホルム)により精製し、N-[2(S)-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニル]-0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン エチルエステル0.54gを得た。

## 第5工程

で5時間攪拌した。減圧濃縮乾固し、残留物を酢酸エチルで抽出し、有機層を5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:クロロホルム)により精製し油状物質22.0gを得た。これとマレイン酸11.1gをエタノール150mlに溶解し、減圧濃縮乾固し、残留物をイソプロピルアルコールより再結晶して、N-シクロヘブチル-DL-アラニン エチルエステルマレイン酸塩(mp125~127°)を20.0g得た。

## 第2工程

この内7.5gを酢酸エチルに溶解し、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固し、N-シクロヘブチル-DL-アラニン エチルエステル4.4gを得た。これを実施例6第2工程で用いたN-(p-メトキシフェニル)-L-アラニン エチルエステルの代りに使用し、以下実施例6の第2工程、第3工程と同様の処理に付し、0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-シクロヘブチル-DL-アラニン エチルエステル2.2



gを得た。

### 第3工程

4-フェニルベンジルピペラジシン10.1gとアクリロニトリル3.3gを50℃で2時間攪拌反応させた。反応液に石油エーテルを加え、結晶化させ、50%アルコールより再結晶して3-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニトリル(mp74~75°)10.4gを得た。この内2.2gを濃塩酸に溶解し、一夜加熱還流させた。反応液を濃縮乾固し、残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)により精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、3-(4-フェニルピペラジニル)プロピオン酸(mp180~187°分解)を1.9g得た。

### 第4工程

この内1.85gをN,N-ジメチルホルムアミド20mlとジメチルスルホキシド20mlに溶解し、攪拌下-15℃に冷却した。N-メチルモルホリン0.55mlを加え、次に塩化イソブチルオキシカルボニル0.71mlを加え、1分後、第2工程で得た0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-シクロヘブチル-DL-アラ

ニンエチルエステル0.82gのTHF10ml溶液を加え、-15℃で30分間攪拌し、室温で1時間攪拌した。減圧濃縮し、残留物を酢酸エチルで抽出し、有機層は5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮してN-[3-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニル]-0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-シクロヘブチル-DL-アラニンエチルエステルを1.5g得た。

### 第5工程

この内0.3gを実施例6第5工程で用いたN-[2(S)-(4-フェニルピペラジニル)プロピオニル]-0'-エチル-γ-D-グルタミル-N-(p-メトキシフェニル)-L-アラニンエチルエステルの代りに使用し、同様の処理に付し、目的物を0.11g得た。  
[α]<sub>D</sub>+1.0°(c=0.2,エタノール)

C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>・1.8H<sub>2</sub>O・0.4dioxaneとして

理論値 C:59.42 H:8.22 N:9.36

実験値 C:59.06 H:7.68 N:9.53

### 実施例8

(2S,3aS,7aS)-1-[D-フェニルアラニル-γ-D-グ

31

ルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

### 第1工程

N-ベンジルオキシカルボニル-D-フェニルアラニン4.8gとN-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド2.9gと水溶性カルボジイミド塩酸塩3.1gとを塩化メチレン中室温で1.5時間攪拌反応させた。反応液を飽和重曹水、10%クエン酸で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固し、N-ベンジルオキシカルボニル-D-フェニルアラニン N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミドエステル7.1gを得た。これと、(2S,3aS,7aS)-1-(γ-D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸4.7gを飽和重曹水200mlとTHF100mlの混合溶媒に溶解し、室温で一晩攪拌させた。減圧濃縮し、残留物を酢酸エチルで洗浄後、水層を塩酸で酸性としクロロホルムで抽出した。有機層は水洗後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ク

32

ロロホルム:メタノール:酢酸=95:5:1)で精製し、(2S,3aS,7aS)-1-[N-ベンジルオキシカルボニル-D-フェニルアラニル-γ-D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸([α]<sub>D</sub>-12.9°(c=0.4,1N-NaOH))7.0gを得た。

### 第2工程

この内0.6gを25%無水臭化水素酸酢酸溶液15mlに溶解し、室温で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残留物をCHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→30%アセトニトリル/水勾配)で精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、目的物を0.4g得た。  
[α]<sub>D</sub>-31.5°(c=0.40,1N-NaOH)

C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>・6.5H<sub>2</sub>Oとして

理論値 C:60.78 H:7.10 N:9.25

実験値 C:60.69 H:7.23 N:9.30

### 実施例9

(2S,3aS,7aS)-1-[N-(8-アミノヘキサニル-γ-D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸

### 第1工程

33

—459—

34

G-(N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキササン酸 4.0gとN-ヒドロキシコハク酸イミド 1.74gと水溶性カルボジイミド塩酸塩 2.9gとを塩化メチレン中室温で5時間攪拌した。反応液を飽和重曹水、10%クエン酸で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し濃縮乾固して、G-(N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキササン酸 N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル 5.3gを得た。この内 2.3gと (2S,3aS,7aS)-1-( $\gamma$ -D-グルタミル)オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸 2.0gと重曹 1.6gとを水-THPの混合溶液に溶解し、室温で一晩攪拌した。減圧濃縮し残留物を酢酸エチルで洗浄後、水層を塩酸で酸性とし、塩化メチレンで抽出した。有機層は、水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液 クロロホルム:メタノール:酢酸=95:5:1)で精製し、(2S,3aS,7aS)-1-[N-[G-(N-ベンジルオキシアミノ)ヘキサニル] $\gamma$ -D-グルタミル]オクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸を 1.97g得た。

35

 $[\alpha]_D^{25} - 30.5^\circ$  (c=0.52, 1N-NaOH)

## 第2工程

この内 1.0gをエタノール 20mlに溶解し、10%パラジウム炭素 0.5gを加え、室温攪拌下、蟻酸アンモニウム 1.1gを加えた。2時間後、触媒を濾去し、濾液を濃縮乾固した。残留物を水に溶解し、希塩酸でpH3に調整後、CHP20Pカラムクロマトグラフィー(0%→50%アセトニトリル/水勾配)で精製し、目的の画分を減圧濃縮乾固し、目的物 0.45gを得た。

 $[\alpha]_D^{25} - 38.2^\circ$  (c=0.30, 1N-NaOH)

 $C_{20}H_{23}N_3O_6 \cdot 0.5H_2O$  として

理論値 C:57.13 H:8.15 N:9.99

実験値 C:57.35 H:7.80 N:10.35

特許出願人 大日本製薬株式会社  
代理人 坪井有四郎

36